

Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite

Crisalejandra Rivera-Pérez, Fernando García-Carreño.
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128,
La Paz, Baja California Sur, 23000, México. E-mail: fgarcia@cibnor.mx*

Palabras clave: interesterificación, lipasas, punto de fusión.

RESUMEN

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances que se han visto reflejados en muchas de sus aplicaciones industriales, como en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos.

Las lipasas microbianas están recibiendo mucha atención debido a su potencial aplicación biotecnológica. Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatálisis. Las lipasas tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables, además de contener una baja proporción de grasas *trans* en el producto final, a diferencia de los procesos de hidrogenación y transesterificación química.

En este trabajo se describen algunas de las aplicaciones industriales de las lipasas microbianas en la industria del aceite y su potencial empleo en tecnología alimentaria.

Key words: interesterification, lipases, melting point.

ABSTRACT

Recently, biotechnology has experienced great advances, the same as its industrial applications, for instance in obtaining chemical products for nutrition and pharmaceuticals. The number of industrial

processes catalyzed by enzymes is more numerous because they offer a series of advantages over non-biological catalysts.

Microbial lipases are currently receiving much attention because of their biotechnological potential. Lipases constitute the most important group of biocatalysts. One of the applications of lipases is in the food industry with the production of fat with suitable physical and chemical properties, with the smallest proportion of *trans* fats in the end product, unlike processes of hydrogenation and chemical trans esterification.

This work describes various industrial applications of microbial lipases in oil industry and lipases potential in food technology.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos, cuyas dos principales características son la extrema especificidad y la increíble velocidad de reacción. Los lípidos están envueltos en diferentes procesos biológicos. La estructura de la membrana celular depende de la combinación de ciertas proteínas y lípidos específicos. Las enzimas lipolíticas juegan un rol importante en la movilización de lípidos entre células individuales de los organismos como también en la transferencia de los lípidos de un organismo a otro (Beisson *et al.*, 2000). Los microorganismos han sido la principal fuente de extracción de diversas enzimas.

Sin embargo, pocas enzimas lipolíticas son las que han sido aisladas en forma pura y cristalizadas,

y poco se conoce acerca de su estructura y función.

Las enzimas se usan extensivamente en la industria: proteasas y lipasas se incluyen en detergentes; amilasas y glucosa isomerasas se utilizan en la obtención de jarabes de glucosa o fructosa a partir de maíz. Todas ellas presentan una gran eficiencia cuando son empleadas en la industria (Cheetham, 1995).

Las enzimas microbianas son más usadas que las enzimas derivadas de plantas o animales, por la variedad de actividades catalíticas, la posibilidad de producir grandes cantidades empleando manipulación genética y el rápido crecimiento de los microorganismos. Las enzimas microbianas presentan mayor estabilidad que las enzimas extraídas de plantas y animales; así mismo su producción es más conveniente y segura (Wiseman, 1995).

Las cepas bacterianas son generalmente más usadas ya que las enzimas extraídas de éstas, ofrecen mayor actividad comparada con las levaduras (Frost, 1987), así mismo tienden a tener actividad en un pH neutro o alcalino y son generalmente termoestables. Estas diferencias sobre los pH óptimos de las enzimas son de mayor importancia en el procesamiento de alimentos. Una enzima tiene que tener buena actividad proteolítica a un pH de 4.5 a fin de ser una enzima a prueba de congelación, o a niveles de pH superiores a 5.5 para ser un buen ablandador de carne. Para la mayoría de las aplicaciones prácticas, el pH del alimento no puede ser ajustado como para adecuarlo al pH óptimo de una enzima determinada. La enzima debe escogerse en base a su actividad al pH natural del alimento. La producción de enzimas por bacterias tiene la ventaja de su costo, generalmente menor y por realizarse en un periodo relativamente breve, además los requerimientos nutricionales son simples a diferencia de los organismos superiores. Una de las herramientas que ha contribuido a

obtener una mayor producción de enzimas y otros metabolitos de interés es la manipulación genética, de este modo, procesos de selección, adaptación y mutación han mejorado considerablemente la producción de enzimas a partir de microorganismos (Hasan *et al.*, 2006).

Las lipasas han sido aisladas de una gran variedad de microorganismos, pero una de las primeras fuentes ha sido la especie *Bacillus*, la cual además de la producción de lipasas, produce otras enzimas de interés industrial como son las celulasas, amilasas, elastasas, etc.

HISTORIA DE LAS LIPASAS

La presencia de lipasas ha sido observada desde 1901 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* (Eijkman, 1901), las lipasas producidas por estos microorganismos han sido estudiadas a detalle. Las enzimas encargadas de hidrolizar triglicéridos han sido estudiadas por más de 300 años, pero la habilidad de las lipasas para catalizar la hidrólisis y también sintetizar esteres ha sido reconocido desde hace apenas 70 años (Van Der Walle, 1927).

En 1856, Claude Bernard descubrió una lipasa en el jugo pancreático, él observó que esta enzima hidrolizaba gotas de aceite insoluble y las convertía en productos solubles.

Las lipasas difieren en varias de sus propiedades, éstas dependen de su origen (el cual puede ser fúngico, bacteriano, de mamíferos, etc.), ellas catalizan la hidrólisis o síntesis de una gran variedad de esteres carboxílicos y liberan ácidos orgánicos y glicerol. Todas ellas muestran una alta especificidad sobre los sustratos.

En años recientes, más de 30 lipasas fueron aisladas de cepas de *Rhizopus* y muchas de ellas han sido caracterizadas (Haas & Joerger, 1995). Las lipasas de *Rhizopus* están relacionadas con las lipasas de *Rhizomucor miehei* (existe una homología >55%), éstas tienen una alta especificidad en la posición 1,3 de triglicéridos, las

cuales las hacen muy versátiles en la modificación de lípidos.

GENERALIDADES DE LIPASAS

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua. Además de su rol fisiológico en la hidrólisis de grasas neutras, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantio- y regio-selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales tales como soya, aceite de pescado, ricino y frutas cítricas (Björkling *et al.*, 1991), así mismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Houde *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que la mayoría de las lipasas comparten una estructura común, un plegamiento de polipéptidos compuesto por 8 láminas β , conectadas por 6 α -hélices (Bornscheuer, 2002). Una importante cualidad de las lipasas es que la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu, esta cubierta completamente por una tapa o "lid" que debe estar completamente abierta para acceder al sustrato, esta triada catalítica está embebida en una región consenso Gly-X-Ser-X-Gly (Jaeger *et al.*, 1999).

Las lipasas desarrollan un mecanismo de acción muy singular, llamado activación interfacial, cuando esta lipasa se encuentra en un medio polar, la tapadera o "lid" se encuentra cerrada. Esto provoca que la enzima esté protegida y solamente pueda llegar a actuar en la interfase agua-aceite generada por una emulsión (Akoh *et al.*, 2004). Las lipasas pueden existir en dos formas. En una de ellas, el centro activo de la lipasa está escondido por una cadena polipeptídica que forma la tapa llamada "lid", bajo esta forma la enzima se dice que está inactiva (forma cerrada). En la forma abierta o activa, la cadena polipeptídica se desplaza y el centro activo se expone al medio de reacción. En una solución acuosa, las lipasas pueden existir en equilibrio entre las dos formas. Este intercambio

entre la forma cerrada y abierta de la enzima provista por la interfase agua-aceite, esta acompañada por cambios conformacionales (Sarda, 1958; Dereweda *et al.*, 1992).

Recientemente, se ha demostrado que muchas de las lipasas tienden a formar agregados moleculares, por adsorción de la forma abierta de la lipasa por la hidrofobicidad del centro activo. Estos agregados presentan diferentes propiedades catalíticas cuando se comparan con una molécula individual (Fernández-Lorente, 2003; Palomo, 2003).

LIPASAS EN LA INDUSTRIA

Las enzimas lipolíticas han cobrado gran atención por su potencial aplicación en biotecnología (Benjamín, 1998). Muchas son las aplicaciones que se han encontrado para las lipasas, en la industria del aceite, la producción de farmacéuticos, agroquímicos y componentes aromáticos (Jaeger, 2002).

Algunos de los productos manufacturados con importancia comercial a partir grasas y aceites producidos por lipasas con gran rapidez y una alta especificidad bajo condiciones controladas son los ácidos grasos poliinsaturados y jabones (Hasan *et al.*, 2006). La enantioselectividad se presenta cuando la enzima actúa sobre un sustrato cuyo carbón secundario no es quiral, denominado proquiral, pero se le denomina así, porque al reaccionar da lugar a un centro quiral, de tal forma que es convertido preferentemente en uno de los dos enantiómeros. Esta enantioselectividad de las lipasas es causada por la diferencia de energía libre entre los sustratos y los estados de transición que forma la enzima (Fig. 1). El comportamiento químico-, regio- y enantioselectivo de estas enzimas ha causado gran interés entre científicos e industriales (Saxena, 2003).

Las lipasas son usadas en dos distintos ámbitos. Ellas son usadas en la catálisis para la manufactura

de otros productos (como ingredientes alimentarios) y por sus aplicaciones (producción de químicos).

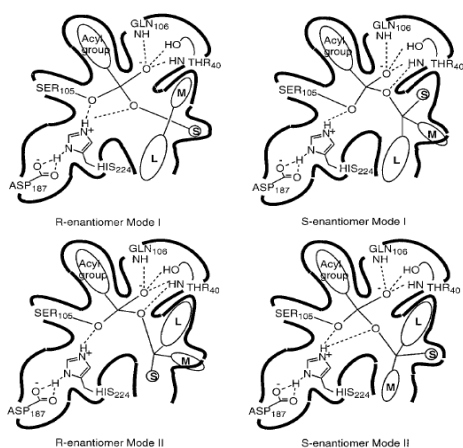


Fig. 1. Formas de los enantiómeros de lipasas (Haefner, 1998).

Dentro de la industria alimentaria, las lipasas, como su nombre lo indica básicamente hidrolizan lípidos produciendo ácidos grasos y glicerol, participan en la acidólisis (reemplazamiento de un ácido graso esterificado por un ácido graso libre), como también en la transesterificación, que consiste en intercambiar el grupo alcoxi (RO-) de un éster por otro alcohol, este tipo de proceso es llevado a cabo para la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal o animal. Por otro lado la interesterificación implica el cambio (al azar) de los ácidos grasos en la estructura del glicerol de la grasa en presencia de un catalizador químico, tal como metóxido de sodio o una enzima (lipasa); este proceso se emplea para producir acilgliceroles modificados que no pueden obtenerse mediante química tradicional (Sharma *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, se puede alterar el punto de fusión de un aceite modificando la composición y/o estructura de sus triglicéridos mediante esterificación, utilizando como co-sustratos determinados ácidos grasos u otros triglicéridos de diferente composición (Schmid

& Verger, 1998). La mayoría de estas reacciones se llevan a cabo a baja actividad de agua, para prevenir la hidrólisis de los ésteres.

Las principales lipasas de microorganismos (Tabla 1) con interés industrial son producidas por hongos (Bruce *et al.*, 1991), pero muchas de las lipasas son extraídas también de bacterias.

Tabla 1. Organismos empleados para la producción de lipasas.

| Organismo | Ácido graso | Posición |
|------------------------------|-------------|----------|
| <i>Candida cylindracea</i> | AGNE | PNE |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | AGNE | PNE |
| <i>Aspergillus niger</i> | C:18 | 1,3- |
| <i>Candida rugosa</i> | C:18 | PNE |
| <i>Mucor miehei</i> | AGNE | 1,3- |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | C:8, C:10 | 1,3- |
| Páncreas porcino | AGNE | PNE |

PNE, posición no específica; AGNE, ácido graso no específico (Droge *et al.*, 2000)

Lipasas en la industria de las grasas

Las lipasas han pasado a ser una parte integral en la actual industria alimentaria. Se ha potenciado el uso de enzimas para mejorar procesos químicos tradicionales en la manufactura alimentaria y, las lipasas, se usan actualmente en la producción de una variedad de productos como quesos y alimentos preparados (Ashok *et al.*, 1999)

Las lipasas se han utilizado para la producción de determinados sabores en quesos y otros alimentos por la producción de ácidos grasos volátiles. Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6), que aportan un sabor fuerte y penetrante, o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por los microorganismos presentes en el queso para

producir otros productos aromáticos, como β -cetoácidos (Schmid & Verger, 1998). Algunas grasas presentan más valor que otras por su estructura. Las grasas con menos valor pueden ser convertidas a grasas más útiles mediante métodos químicos, sin embargo los productos generados son inespecíficos, esto es producido por una catálisis aleatoria, es decir que cualquiera de las tres posiciones de una grasa neutra puede ser hidrolizada. Las lipasas pueden catalizar la transesterificación de aceites con bajo valor, para la producción de productos con alto valor comercial, como la mantequilla de cocoa.

Las lipasas también catalizan la transesterificación en solventes orgánicos, esta propiedad permite la producción de una variedad de productos como sustitutos de grasa, diseño de grasas y producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (Nakajima *et al.*, 2000). Por otro lado las lipasas obtenidas a partir de *Mucor miehei* (IM 20) y *Candida antarctica* (SP 382) se emplean para la esterificación de ácidos grasos libres en ausencia de solventes orgánicos o transesterificación de metil ester en hexano con isopropildieno glicerol (Akoh, 1993).

La interesterificación y la hidrogenación son técnicas útiles en la preparación de productos para la manufactura de margarinas y mantequillas. En una reacción convencional de interesterificación, esta reacción es llevada a cabo por la presencia de metoxilato de sodio. Sin embargo, la reacción no es selectiva con respecto a la esterificación de un ácido graso en un triglicérido. Por otro lado, el empleo de lipasas para la interesterificación, se lleva a cabo por la presencia de agua para la activación de la lipasa. La presencia de agua causa

la hidrólisis de glicéridos interesterificados sobre acilglicerol específicos.

La lipasa más comúnmente empleada para la industria alimentaria es la 1,3-lipasa de *Rhizomucor miehei*, que esta disponible comercialmente por Novozymes, Biocatalysts y Amano, así mismo se considera una enzima GRAS (Generally Recognised As Safe) por la FDA. (Food and Drug Administration). Empleando esta enzima es posible cambiar los ácidos grasos y modificar las características de la grasa, sin embargo la posición 2 del triglicérido no es tocado (figura 2). La preservación de la posición 2 del triglicérido permite generar una grasa más natural, que puede ser metabolizada por el organismo fácilmente, caso contrario en la interesterificación química, donde todas las posiciones son esterificadas indistintamente (Goh *et al.*, 1993).

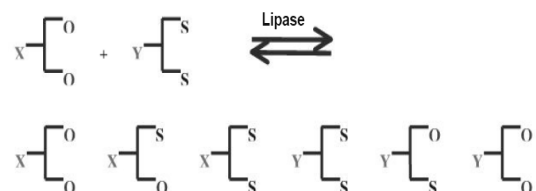


Fig. 2. Interesterificación por 1,3 lipasa. Obtenido de: Husum *et al.*, 2000.

El proceso enzimático es mucho más sencillo que el químico y para este proceso no es necesario emplear un tratamiento posterior. Este efecto de interesterificación de las lipasas sobre los triglicéridos permite modificar el punto de fusión de las grasas (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la catálisis aleatoria sobre el punto de fusión de algunas grasas.

| Grasa | Punto de fusión (°C) | |
|------------------------------|----------------------|---------|
| | Antes | Después |
| Aceite de soya | -7.4 | 9.9 |
| Aceite de semilla de algodón | 11.5 | 34 |
| Aceite de coco | 26 | 28.2 |
| Mantequilla de cocoa | 34 | 51 |

Tomado de: Going, 1967.

La mantequilla de cocoa es un producto de alto valor comercial porque es rico en esteareato, este lípido le permite tener un punto de fusión de 37°C. Esta propiedad le provee características sensoriales deseables por el consumidor. Uno de los ejemplos más conocidos en el empleo de la interesterificación enzimática es la transformación de aceite de palma en un sucedáneo de la manteca de cocoa, componente principal del chocolate (Posorke *et al.*, 1988). El chocolate contiene aproximadamente un 30% de manteca de cocoa, por lo que este proceso es potencialmente interesante para la industria. Esto se hace mediante el empleo de una lipasa específica en la posición 1,3, que actúe sobre el aceite de palma cambiando los ácidos grasos por ácido esteárico.

El proceso de interesterificación resulta en la formación de nuevos triglicéridos, principalmente tripalmitina y diaminoestearina, a partir de aceites de bajo valor comercial, como el aceite de palma. Estos cambios en la composición resultan en modificaciones de las propiedades del aceite, principalmente en el punto de fusión, que cambia de 25.5°C a 36.3°C (Yassin *et al.*, 2003).

Una de las ventajas que tiene el empleo del proceso de interesterificación enzimática, es el empleo de reactores enzimáticos, donde las enzimas están inmovilizadas, el más común dentro

de esta industria es el lecho empaquetado, en continuo y reciclado. La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Las ventajas de este tipo de reactores es que permite una mayor estabilidad de la enzima, lo que permite disminuir costos (Arroyo, 1998). Este tipo de procesos no requiere más de 70°C para llevar a cabo la interesterificación, a diferencia de la interesterificación química donde la temperatura asciende a 100°C

USO DE LIPASAS TERMOESTABLES

Las enzimas termoestables pueden ser obtenidas de organismo mesofílicos y termofílicos; se han obtenido algunas enzimas termofílicas a partir de organismos psicrófilos (Imamura, 2000). Los principales organismos de los cuales se han extraído enzimas de interés industrial son hipertermófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermotoga sp* (Adams *et al.*, 1995). Otros organismos como hongos son productores de lipasas termoestables (tabla 3).

La termoestabilidad dentro la biocatálisis tiene varias ventajas, como el manejo de altas temperaturas de operación, lo que permite una alta reactividad, alta estabilidad, alto proceso de producción (incremento de solubilidad de sustratos y productos), baja viscosidad y permite disminuir problemas por contaminación (Mozhaev, 1993).

Tabla 3. Hongos productores de lipasas termoestables

| Organismo | T opt. °C | pH opt. |
|---------------------------|-----------|---------|
| <i>Candida antarctica</i> | 70 | 6.5 |
| <i>Candida curvata</i> | 50-60 | 6.5 |
| <i>Mucor miehei</i> | 40 | 7.0 |

Las enzimas lipolíticas termoestables han sido aplicadas en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, así mismo, han sido usadas para la producción de farmacéuticos, agroquímicos, cosméticos y sabores en la industria alimentaria.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Actualmente, la modificación de grasas y aceites es una de las áreas en la industria del procesamiento de alimentos que demanda atención. El uso de aceite vegetales con triglicéridos importantes y su posterior modificación fisicoquímica tienen un gran potencial en el mercado futuro. El uso de lipasas en la industria ha presentado ventajas considerables sobre los procesos de interesterificación química. El calor requerido es mucho menor, las bajas temperaturas impiden la formación de grasas *trans*, permitiendo así la producción de grasas con menos insaturaciones, los cuales pueden ser obtenidos sin procesos de refinamiento. La obtención de grasas modificadas permite su implementación como aditivos alimentarios, tales como los diacilgliceroles, que son los principales constituyentes de los aceites de cocina. Estos aceites disminuyen el incremento de triglicéridos en la sangre, permitiendo así, prevenir la acumulación de grasas y altos niveles de colesterol en la sangre.

REFERENCIAS

- Adams M, Perler F, Kelly R (1995) Extremozymes: expanding the limits of biocatalyst. *Bio/Technology*, 13: 662-668.
- Akoh CC (1993) Lipase-catalysed synthesis of partial glyceride. *Biotechnol Lett*, 15: 949.
- Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Lipid Res*. 43: 534-552.
- Arroyo M (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39: 23-39.
- Ashok P, Sailas B, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.
- Beisson F, Arondel V, Verger R (2000) Assaying *Arabidopsis* lipase activity". *Biochem. Soc. Trans.* 28: 773-775.
- Benjamin S, Pandey A (1998) *Candida rugosa* lipase: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14: 1069-1087.
- Björkling F, Godtfredsen SE, Kira O (1991) The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9: 360-363.
- Bornscheuer UT (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbial. Rev.* 26: 73-81.
- Bruce LZ, Henrik KN, & Robert LS (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.* 8: 71-82.
- Cheetham PSJ (1995) Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing *In: Wiseman A., editor. Handbook of enzyme biotechnology.* UK: Ellis Horwood. pp. 83-234.

- Derewenda ZS, Derewenda U (1992) The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227: 818-839.
- Dröge MJ, Pries F & Quax WJ (2000) Directed evolution of *Bacillus* lipase. *In: lipases and Lipids: Structure, Function and Biotechnological Applications.* Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V. (eds), pp.169-180.
- Eijkman CU (1901) Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 29: 841-848.
- Fernández-Lorente G, Palomo JM, Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, (2003) Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnol. Bioeng.* 82: 232-237.
- Frost GM, Moss DA (1987) Production of enzyme by fermentation. *In: Biotechnology*, vol. 7a. Rehm HJ & Reed G (eds). Weinheim: Verlag Chemie, pp.65-211.
- Goh SH, Yeong SK & Wang CW (1993) Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: effect of solvent on 1,3 specificity. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 70: 567-570.
- Going LH (1967) Interesterification products and processes. *J. Am Oil Chem. Soc.* 44: 414-422.
- Haas MJ, Joerger RD (1995) Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*, versatile catalysts in nature and the laboratory. *In: Food Biotechnology: Microorganism.* Khachatourians GG & Hui YH (eds), VCH, Weinheim, pp. 549-588.
- Hæffner F, NT, Hult K (1998) Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophys. J.* 74: 1251-1262.
- Hasan Fariha, Ali Shah Aamer, Hameed Abdul (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.* 39: 235-251.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.
- Husum TL, Pedersen LS, Nielsen PM, Christensen MW, Kristensen D & Holm (2000) Enzymatic interesterification: process advantages and product benefits. *Palm Oil Develop.* 39: 8-10.
- Imamura S, Kitaura S (2000) Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257, *J. Biochem.*, 127: 419-25.
- Jaeger KE, Dijkstra BW & Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jaeger KE & Egger T (2002) Lipases for biotechnology". *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Mozhaev V (1993) Mechanism-based strategies for protein thermo stabilization. *Trends Biotechnol.* 11: 88-95.
- Nakajima M, Snape J, Khare SK (2000) Method in non-aqueous enzymology *In: Biochemistry.* Gupta MN (ed). Basel: Birkhauser Verlag, pp. 52-69.
- Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2003) General trend of lipase to self-assembly living bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromol.* 4: 1-6.

- Posorke LH, Lefebvre GK, Miller CA, Hansen TT, Glenving BL (1988) Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 65: 922-926.
- Sarda L, Desnuelle P (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. *Biochim. Biophys Acta*, 30: 513-521.
- Saxena RK, Sheroan A, Giri B, Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbial Meth.* 52: 1-18.
- Schmid RD & Verger R (1998) Lipases: Interfacial enzymes with atractives application. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Van Der Walle N (1927) Uber synthetische wirkung bakterieller lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr*, 70: 369-73.
- Wiseman A (1995) Introduction to principles. *In: Handbook of Enzyme Biotechnology.* 3rd ed. Wiseman A (ed). Padstow, Cornwall, Uk: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd., pp. 3-8.
- Yassin AA, Mohamed IO, Ibrahim MN, Yussof MS (2003) Effect of enzymatic interestification on melting point of palm olein. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 110: 45-52.